

Histochemische Untersuchungen
der Grundsubstanz im belasteten und
unbelasteten Gelenkknorpel und
ihre Beziehung zu den Zellen mit PJS-Technik,
Toluidinblau-Metachromasie
und Alcianblau-Kernechtrot-Färbung

von

RÜDIGER ALBRECHT

1965

AUS DEM ANATOMISCHEN INSTITUT DER UNIVERSITÄT MÜNCHEN
Direktor(Vorstand): Professor Dr. T.v. Lanz

HISTOCHEMISCHE UNTERSUCHUNGEN DER GRUNDSUBSTANZ
IM BELASTETEN UND UNBELASTETEN GELENKKNORPEL
UND IHRE BEZIEHUNG ZU DEN ZELLEN MIT PJS-TECH-
NIK, TOLUIDINBLAU-METACHROMASIE UND ALCIANBLAU-
KERNECHTROT-FÄRBUNG

INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin
verfaßt und einer Hohen Medizinischen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Rüdiger Albrecht
aus
München
1961



Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Priv.-Doz. Dr. J. Lang

Mitberichterstatter: Prof. Dr. T.v. Lanz

Dekan: Prof. Dr. W. Seitz

Tag der mündlichen Prüfung: 19. Dezember 1961

Inhaltsübersicht

Fragestellung.....	4
I. Material und Technik.....	5
II. Befunde.....	9
1.) PJS-Technik.....	10
a.) Vor-, Kontroll- und Verdauungsversuche...	11
b.) Auswertung der Hauptfärbungen.....	13
2.) Metachromasie mit Toluidinblau.....	17
3.) Alcianblau-Kernechtrot-Färbung.....	18
III. Diskussion.....	21
IV. Zusammenfassung.....	25
V. Schrifttum.....	27
VI. Lebenslauf.....	31

FRAGESTELLUNG

Der Untersuchung liegt die Frage der histotopographischen Verteilung von Grundsubstanz und Zellen belasteter und unbelasteter Knorpelabschnitte zugrunde. Die Elektronenmikroskopie stellt den Ort der Bildung des Mucopolysaccharid-Proteinkomplexes durch die Zellen klar (CURRAN 1953, KLING und CAMERON 1955, GROSSFELD und Mitarbeiter 1955, 1956, 1957, MANZINI und Mitarbeiter 1956, TAYLOR und Mitarbeiter 1956, YIELDING und Mitarbeiter 1957, BERENSON und Mitarbeiter 1958). Nach autoradiographischen Untersuchungen mit S^{35} -Sulfat stellten BÉLANGER (1954) und AMPRINO (1955) fest, daß S^{35} zuerst in den Zellen und später erst in der Grundsubstanz erscheint.

Die Grundsubstanz des Knorpels stellt die Verbindung zwischen den kollagenen Fibrillen her (Walter MÜLLER, 1929). Dadurch werden diese untereinander verkittet und widerstandsfähig. In den oberflächlichen Schichten fehlt die Grundsubstanz. BENNINGHOFF sieht darin eine Anpassung an spezielle mechanische Beanspruchungen. Für die funktionelle Leistungsfähigkeit des Knorpels, insbesondere für die Aufnahme von Druckbelastung ist die hyaline Grundsubstanz verantwortlich (VIERNSTEIN, 1958). MATTHEWS (1952) sieht in ihr einen wesentlichen Faktor für die Elastizität. Bei krankhaften und auch bei altersbedingten Veränderungen ist die Grundsubstanz vermehrt (SCHALLOCK, 1957). Deshalb wurde versucht, das Verhältnis von Grundsubstanz zu Knorpelzellen während der Alterung zu bestimmen.

Außerdem wies MATTHEWS (1952) auf chemische Unterschiede zwischen belasteten und unbelasteten Knorpelabschnitten hin.

Schon makroskopisch fallen Knorpel auf, deren Oberfläche oft nicht glatt, weiß und spiegelnd ist, sondern samtartig aufgerauht. Manchmal sind auch leichte Usuren nachzu-

weisen. Außerdem kommen bei älteren Menschen etwas verdünnte, gelbliche Knorpel zur Beobachtung. Sie zeigen makroskopisch keine Veränderungen der Oberflächenstruktur. Die Fragestellung der vorliegenden Untersuchung lautet: sind histologische Unterschiede der Knorpelstruktur alter und junger Menschen nachweisbar? Bestehen Strukturunterschiede - und wir konnten solche Unterschiede nachweisen - dann fragt sich, ob auch zwischen belasteten und unbelasteten Knorpelabschnitten Differenzen vorhanden sind. Schließlich war zu klären, ob die makroskopisch sichtbaren Veränderungen auch histologisch nachweisbar sind.

I. MATERIAL und TECHNIK

Für die Untersuchungen wurden Knorpel von Leichen benutzt. Er stammte aus allen Altersklassen (4 Monate alter Säugling bis zum 74-jährigen Greis). Die Knorpelstückchen sind, wenn es nicht ausdrücklich anders vermerkt wird, dem linken Schulter- und dem linken Kniegelenk entnommen.

Als unbelastet betrachte ich die mittleren Teile der dorsalen Abschnitte der Femurcondylen und ein Stück aus dem mittleren Teil des Gelenkkopfes vom Humerus. Als belastet dagegen die mittleren Bezirke der distalen Flächen der beiden Femurcondylen, sowie einen Teil der Facies articularis patellae.

Die Entnahme des Knorpelmaterials erfolgte ausschließlich bei Obduktionen. Gewöhnlich entnahm ich das Material 19 Stunden post mortem. Bei zwei Leichen erst 32 Stunden nach dem Tode.

VIERNSTEIN (1958) stellte bei Kontrollen innerhalb der 24-Stundengrenze keine Änderungen des prozentualen Verhältnisses zwischen dem Kollagen und der Chondroitinschwefelsäure fest.

Der Knorpel wird an der Knorpelknochengrenze abgetragen und dann für die Gefriertrocknung in ca. 1 mm dicke Scheibchen zerlegt. Zwischen der Entnahme und dem Einfrieren in Isopentan liegt durchschnittlich eine Zeitspanne von 10 Minuten. Das Isopentan ist mit flüssiger Luft gekühlt.

Für die Gefriertrocknung diente die Anlage G 01 von der Firma LEYBOLD. Als Kühlmedium während der bei einem Vakuum von 10^{-3} Torr durchgeführten Trocknung benutzte ich ein Alkohol-Kohlensäureeisgemisch mit ziemlich konstanten Temperaturen von -75° bis -78° C. Durchschnittlich wurde eine Trockenzeit von 50 Stunden je Präparat benötigt. Gegen Ende der Trocknung erhöhte ich die Temperatur etwa 3 Stunden auf Zimmertemperatur, um die Restfeuchtigkeit zu entfernen.

Die Einbettung in Paraffin erfolgte im Vakuum. Nachdem die Gewebestückchen im geschmolzenen Paraffin eingetaucht waren, stellte ich die Paraffinheizung ab, um das Gewebe im nativen Zustand zu erhalten.

Neben der Gefriertrocknung fixierte ich Kontrollpräparate in Formol-Alkohol.

Zur histochemischen Untersuchung gelangten Paraffinschnitte von 7 μ Dicke. Ich erhielt zwei Serien, nämlich die Schnitte vom gefrorengetrockneten und die vom formolalkoholfixierten Material. Sie wurden trocken auf die mit Eiweiß-Glycerin bestrichenen Objektträger aufgezogen.

Die gefriergetrockneten Gewebeblocke ließen sich besser schneiden, als die formolalkoholfixierten. Dagegen hafteten die formolalkoholfixierten Schnitte besser am Objektträger als die anderen. Um die Haftfähigkeit der Schnitte zu erhöhen und um Grundsubstanzverluste zu vermeiden, wurden sie mit Celloidin überzogen.

Zur Darstellung der zu untersuchenden Substanzen in den Schnitten benutzte ich drei Färbeverfahren.

1. die PJS-Technik nach HOTCHKISS mit der Perjodsäurelösung A. Das SCHIFF'sche Reagens dafür stellte ich nach dem Vorschlag von GRAUMANN her.
2. die Färbung mit Toluidinblau nach HOLMGREN. 1 %ige wässrige Lösung des Farbstoffes wirkte 2 Minuten auf die Schnitte ein. Anschließend wurden die Schnitte 10 Minuten lang in einmal gewechseltem 96 %igen Alkohol differenziert.
3. Alcianblau-Kernechtrot-Färbung.

Klinische Angaben über die Leichen, denen der Knorpel für die Untersuchungen entnommen wurde.

1. 4 Monate alter weiblicher Säugling
Todesursache: Kreislaufversagen,
äußerlich normaler Knorpel.
Knorpelverarbeitung: 32 Stunden p.m.
2. 22-jährige Frau, von athletischem Körperbau
Todesursache: Verkehrsunfall, Schädelzertrümmerung,
äußerlich normaler Knorpel.
Knorpelverarbeitung: 16 1/2 Stunden p.m.
3. 22-jähriger Mann, von athletischem Körperbau
Todesursache: Herztod, Gefäßanomalie, Erguß im Pleuraraum nach Oesophagusruptur, an Patella rinnenförmige Einbuchtungen, sonst makroskopisch normaler Knorpel.
Knorpelverarbeitung: 20 Stunden p.m.
4. 32-jährige Frau, von athletischem Körperbau,
Todesursache: Schädelbasisbruch nach Unfall, äußerlich normaler Knorpel.
Knorpelverarbeitung: 19 1/2 Stunden p.m.
5. 38-jähriger Mann, von athletischem Körperbau,
Todesursache: Verkehrsunfall, Schädelzertrümmerung,
äußerlich normaler Knorpel.
Knorpelverarbeitung: 21 Stunden p.m.

6. 46-jährige Frau, von leptosomer Konstitution
Todesursache: amyotrophische Lateralsklerose, hat längere Zeit im Bett gelegen, makroskopisch normaler Knorpel.
Knorpelverarbeitung: 12 Stunden p.m.
7. 47-jähriger Mann, Leptosom mit athletischem Einschlag
Todesursache: CO-Vergiftung, an den belasteten Femurcondylen waren rinnenförmige Einbuchtungen, sonst ist der Knorpel äußerlich normal.
Knorpelverarbeitung: 19 Stunden p.m.
8. 54-jähriger Mann, von athletischem Körperbau
Todesursache: Unfall, Wirbelsäule im Halsbereich und der Medulla oblongata durchtrennt, makroskopisch normaler Knorpel.
Knorpelverarbeitung: 18 1/2 Stunden p.m.
9. 57-jähriger Mann, von pyknischem Körperbau
Todesursache: cerebrale Blutung, Leukämie, normaler Knorpelbefund, hat vorher einige Wochen zu Bett gelegen.
Knorpelverarbeitung: 9 Stunden p.m.
10. 59-jähriger Mann, Leptosom mit athletischem Einschlag,
Todesursache: Hirnblutung, Aneurysma, äußerlich normaler Knorpel, Genu varum.
Knorpelverarbeitung: 32 Stunden p.m.
11. 59-jähriger Mann, von leptosomischer Konstitution
Todesursache: Verkehrsunfall, rechts Unterschenkelprothese, leichtes Genu varum, laterale Femurcondyle und Patella gelbbraun verfärbt und aufgefasert.
Knorpelverarbeitung: 9 Stunden p.m.
12. 62-jähriger Mann, von pyknischer Konstitution
Todesursache: Rectum- und Leber-Ca, hat längere Zeit im Bett gelegen, Knorpel ist an den Rändern gelbbraun verfärbt.
Knorpelverarbeitung: 17 Stunden p.m.
13. 65-jähriger Mann, von leptosomischer Konstitution
Todesursache: Verkehrsunfall, Verblutung, makroskopisch normaler dünner Knorpel.
Knorpelverarbeitung 17 1/2 Stunden p.m.

14. 67-jähriger Mann, von leptosomischer Konstitution
Todesursache: Urämie nach lymphatischer Leukämie,
äußerlich normaler Knorpel vom linken Humerus und rechten Kniegelenk, hat längere Zeit im Bett gelegen.
Knorpelverarbeitung: 22 Stunden p.m.
15. 74-jähriger Mann, von athletischem Körperbau
Todesursache: Verkehrsunfall, Wirbelsäulenabriß,
Knorpel gelbbraun verfärbt, besonders an Patella und patellarer Fläche der Condylen stark aufgefasert.
Knorpelverarbeitung: 21 Stunden p.m.

I. BEFUNDE

Es lassen sich die drei von BENNINGHOFF angegebenen Zonen innerhalb des Gelenkknorpels deutlich voneinander abgrenzen. Er teilt den Gelenkknorpel in eine oberflächliche Tangentialfaserschicht, in eine Übergangszone und eine Radiärfaserschicht ein.

Die Tangentialfaserschicht ist durch zahlreiche annähernd tangentielle, ineinander verflochtene Fasergruppen charakterisiert. Zwischen den Fasern liegen verhältnismäßig kleine und abgeplattete Knorpelzellen. Sie sind wie die Fasern orientiert, d.h. ihr größter Durchmesser ist oberflächenparallel gelagert. Auf die Tangentialfaserschicht folgt die Übergangszone. Hier liegen die Zellen unregelmäßig verteilt. Sie sind meist abgerundet, kugelig und ovoid. Durch Teilung nehmen sie die Gestalt von Kugelsegmenten an. Die Übergangszone nimmt den Mittelbezirk des Gelenkknorpels ein. Zwischen ihr und dem Knochen befinden sich die Zellen der Radiärfaserschicht. Sie passen sich ebenfalls der Faserrichtung an, d.h. ihre größten Durchmesser stehen senkrecht. Die Dicke des Knorpels wird im Wesentlichen von der Ausdehnung der Radiärfaserschicht bestimmt.

Die Zellen sind von einem kapselartigen Grundsubstanzsaum umgeben, der gleichmäßig dünn ist und die Zellform wiedergibt. Diese Kapsel läßt sich durch ihr optisches und mikrochemisches Verhalten von ihrer unmittelbaren Umgebung unterscheiden. Die der Zelle direkt anliegende Zone wird als Kapsel bezeichnet (SCHAFFER, 1930). Die Zellen sind in Grundsubstanz eingebettet. Die Kapsel wird vom sogenannten Zellhof umhüllt. Häufig umgreift ein Zellhof mehrere Kapseln. Der Zellhof ist dicker als die Kapsel. Er ist ein Teil der Grundsubstanz. Die scheinbar homogene Grundsubstanz breitet sich zwischen den Zellhöfen aus und verbindet sie untereinander. An einigen Stellen fand sich die Grundsubstanz schmal, an anderen breiter ausgebildet.

Bei den drei verschiedenen Färbungen läßt sich die zonale Einteilung stets feststellen. Die Intensität der Färbung nimmt bei der PJS-Technik und der Toluidinblau-Metachromasie von der perichondralen oberflächlichen Tangentialfaserschicht über die mittlere Übergangszone zur Radiärfaserschicht zu. Die Zellhöfe sind bei der PJS-Technik schwächer angefärbt als das Zellplasma und die Grundsubstanz. Mit der Toluidinblau-Metachromasie zeigen sie orthochromatische Farbreaktion.

Anders verhält sich die Grundsubstanz bei Färbung mit Alcianblau. Dabei ist die oberflächliche Tangentialfaserschicht intensiver gefärbt als die zentraler gelegenen Übergangs- und Radiärfaserschichten. Das Zellplasma ist hier nicht angefärbt.

1. PJS-Technik

Schon beim makroskopischen Betrachten der gefärbten Gewebeschnitte fällt ein Unterschied der Farbtintensitäten zwischen dem gefriergetrockneten und dem formolalkoholfixierten Material auf. Die mit Formolalkohol behandelten Knorpelstückchen sind stärker gefärbt. Nach der For-

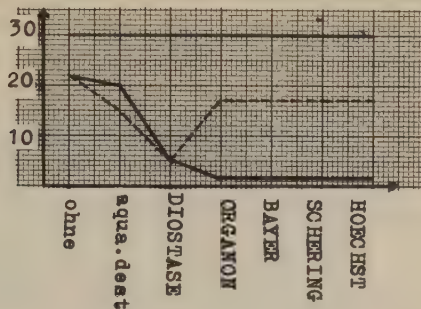
moleinwirkung laufen anscheinend zwei voneinander unabhängige Prozesse im Gewebe ab (HOLCZINGER, 1958), in deren Folge Aldehydgruppen entstehen. Weiterhin hält HOLCZINGER es für möglich, daß die Formolfixierung die Gewebe strukturell derartig verändert, daß ungesättigte Lipide der Oxydation zugänglich gemacht werden. Für enge Beziehungen zwischen SCHIFF-positiven Aldehyden und Lipoiden spricht die gleiche Lokalisation beider Substanzen. Außerdem kommt den Aldehydgruppen des Formalins eine ausschlaggebende Bedeutung zu. FRENCH und EDSALL (1945) haben die Bildung eines Formalin-Eiweiß-Komplexes bewiesen.

a.) Vor-, Kontroll- und Verdauungsversuche:

Um die nachzuweisenden Substanzen sicher erfassen zu können, wurden Vor-, Kontroll- und Verdauungsversuche vor den Färbungen der Serien durchgeführt. Nach dem Vorversuch blieben die Schnitte ungefärbt. Damit sind freie Aldehydgruppen oder andere störende Substanzen ausgeschlossen. Für die Kontrollversuche führte ich die reversible Acetylierung nach McMANUS und GASON (1951) durch. Diese Kontrollversuche fielen positiv aus. Das Färbeargebnis des Hauptversuches ist daher hauptsächlich auf Glykolgruppen zurückzuführen. Durch die anschließende Entacetylierung werden nämlich die ursprünglichen Hydroxylgruppen wieder hergestellt, wahrscheinlich aber nicht auch die Aminogruppen.

Zur Kontrolle der Verdauungsversuche benutzte ich celloidinisierte und nicht celloidinisierte Schnitte. Ich stellte sie 15 Stunden bei 38° C in den Thermostaten. Veränderungen der Färbbarkeit durch destilliertes Wasser, 1 %ige wässrige Diastaselösung und die Hyaluronidasepräparate von ORGANON, BAYER, SCHERING und HOECHST waren gegenüber den in den Serien gefärbten Schnitten nicht feststellbar. Für die Vergleiche der Farbintensitäten zwischen den so behandelten Schnitten und normalen Serien fertigte ich

eine Farbskala an. Zur Herstellung der Skala stellte ich



Kurve 1. Abhängigkeit der Farbintensitätseinheiten des Plasmas und der Grundsubstanz vom Verdauungsmittel bei celloidinierten und nicht celloidinierten Schnitten. Die Werte von 30 Einheiten entsprechen den celloidinierten Schnitten.

eine 1 %ige wässrige Hämalaunlösung her. 0,5 ml dieser Lösung verdünnte ich mit der gleichen Menge Wasser. Davon nahm ich 0,5 ml und gab die gleiche Menge Wasser zu, usf. Von diesen verdünnten Lösungen tropfte ich je einen Tropfen auf ein Blatt weißes Papier und ließ es eintrocknen. Die höchsten Zahlenwerte gab ich den konzentrierten Lösungen, die niedrigeren Werte den entsprechenden Verdünnungen. Während die Farbintensitäten der verdauten, aber celloidinierten Schnitte im Plasma und in der Grundsubstanz konstant dem Wert von 30 Farbeinheiten (s. Kurve 1) entsprechen, weichen die Werte bei den nichtcelloidinierten beträchtlich ab.

Die nichtcelloidinierten Schnitte sind weniger intensiv gefärbt, als die Serienschnitte und die der Verdauung ausgesetzten, aber celloidinierten Schnitte. Es sind viele Zellen herausgefallen. Trotzdem lassen die noch erhaltenen Zellen eine befriedigende Aussage über die Anfärbung ihres Plasmas zu.

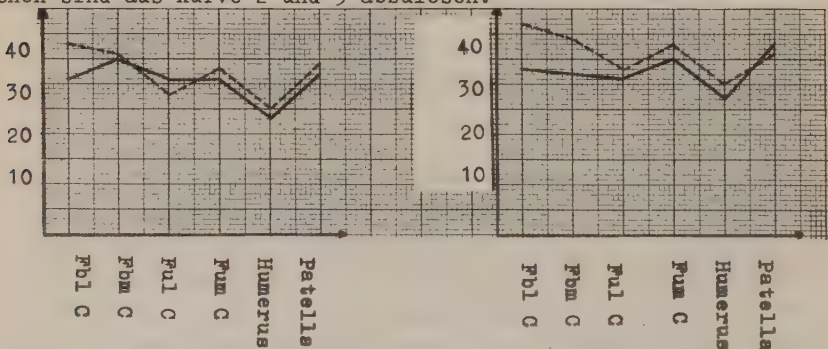
Bei den nichtcelloidinierten Schnitten nimmt die Farbin-

tensität nach Extraktion mit destilliertem Wasser nur gering ab. Der Einfluß der Diastase auf die Farbtensität ist deutlich im Plasma und in der Grundsubstanz. Die Farbtensität ist abgeschwächt. Nach Verdauung mit Hyaluronidasepräparaten ist eine Färbung des Plasmas nicht erfolgt. Die Intensität der Grundsubstanzfarbe ist geringer. LAVES (1948) führt die schwächere Anfärbung auf einen Verlust der Basophilie durch die hydrolytische Spaltung der Chondroitinschwefelsäure mit Hyaluronidase zurück.

b.) Auswertung der Hauptfärbungen:

Sämtliche Schnitte sind nach Vorschrift (LIPP, 1954) celloidinisiert. Die Grundsubstanz erweist sich in der Tangentialfaserschicht, in der Übergangszone und in der Radiärfaserschicht als HOTCHKISS-positiv. Ebenso ist das Plasma diffus angefärbt.

In der perichondralen Tangentialfaserschicht sind Anzahl der Zellen und Farbtensität nur gering. Die meisten Knorpelstückchen zeigen am histologischen Schnitt eine stete Zunahme der Zellenzahl, Zellengröße und Farbtensität von der Tangentialfaserschicht zur Radiärfaserschicht. Die Mittelwerte von Zellzahl und Farbtensitätseinheiten belasteter und unbelasteter Knorpelabschnitte von 15 Leichen sind aus Kurve 2 und 3 abzulesen.



Kurve 2. Verhältnis der Mittelwerte von Zellzahl und Farbtensitätswerten bei gefrorengetrocknetem Material nach PJS-Technik.

Kurve 3. Verhältnis der Mittelwerte von Zellzahl und Farbtensitätswerten bei formolalkoholfixiertem Material nach PJS-Technik.

(Erklärung der Abkürzungen: b = belastet, u = unbelastet, l = lateral, m = medial, C = Condyle, F = Femur)

Von den Leichenknorpeln fallen im histologischen Bild einige besonders auf. Sie sind entweder makroskopisch verändert oder stammen von Menschen, die eine überwiegend stehende Beschäftigung ausübten oder von solchen, die durch übernormale Körpergewichte auffallen.

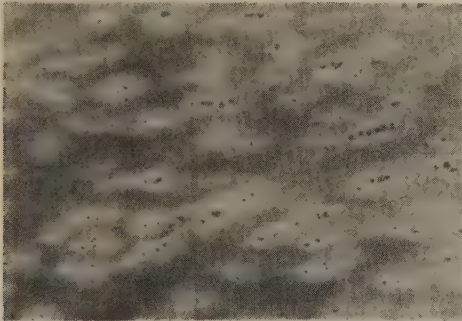
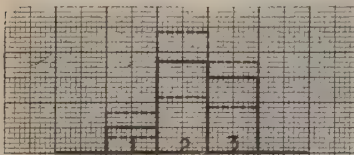


Abb. 1. Knorpel der linken belasteten lateralen Femurcondyle eines 74-jährigen athletischen Mannes. Übergangszone mit HOTCHKISS-positiven Zelleibern, die Zellhöfe sind HOTCHKISS-negativ, die intercelluläre Grundsubstanz reagiert positiv. Fixierung mit Formol-Alkohol, Schnittdicke 7 μ , Färbung nach der PJS-Technik mit Perjodsäurelösung A, Vergr. 113-fach.

In den mikroskopischen Schnitten der Knorpel nimmt die Farbtintensität in der Übergangszone plötzlich zu. Sie ist auch der zellreichste Abschnitt. Makroskopisch sichtbare



Säule 1. Mittelwerte der Zellzahl pro Gesichtsfeld (Okular 15x, Objektiv 6x) aus den drei Knorpelschichten von 15 Leichen. gestrichelt: höchste und niedrigste Werte.

- 1 = Tangentialfaserschicht
- 2 = Übergangszone
- 3 = Radiärfaserschicht

pathologische Veränderungen zeigen alle belasteten Knorpelabschnitte eines pyknischen 62-jährigen Mannes, der längere Zeit bettlägerig war. Schwere degenerative Knorpeldefekte eines 74-jährigen Mannes von athletischem Körperbau fielen auf. Belastete und unbelastete Knorpelstücke sind makroskopisch stark aufgefasst und zeigen im histologischen Bild Ansammlungen von

dreißig bis vierzig Zellen in den oberflächlichen Schichten.

Bei den Leichenknorpeln, die nicht diese schweren pathologischen Veränderungen zeigen, sind die Zellen in Gruppen von drei und vier Zellen oder einzeln angeordnet. Der Knorpelüberzug einer Patella eines 67-jährigen Mannes von leptosomer Konstitution war sehr dünn. Ebenfalls makroskopisch unverändert, aber bei der mikroskopischen Betrachtung auffallend erweisen sich die belastete laterale Femurcondyle und die Patella eines schweren athletisch gebauten 54-jährigen Zimmermannes, die belastete laterale und mediale Femurcondyle und Patella eines stark adipösen 57-jährigen Mannes und die Patella eines 59-jährigen Schmiedes mit deutlichem Genu varum.

Die Radiärfaserschicht zeigt stets die größte Farbsintensität. Die Zellenzahl ist geringer als in der Übergangszone. Da die Radiärfaserschicht zellärmer ist, enthält sie relativ am meisten Interzellulärschicht. Auch in dieser Schicht wichen die histologischen Befunde einiger Knorpel von den übrigen ab. Sie zeichnen sich durch sehr große Farbsintensität aus. Diese Knorpel waren schon makroskopisch verändert. Sie stammten von einem 59-jährigen Ziegeleiarbeiter von leptosomischer Konstitution. Er trug rechts eine Unterschenkelprothese und hatte ein

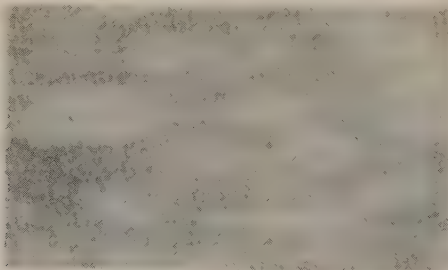
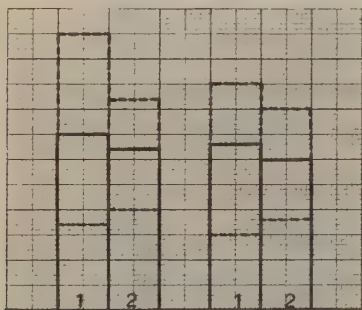


Abb. 2. Knorpel aus der linken unbelasteten medialen Femurcondyle eines 74-jährigen athletisch gebauten Mannes. Radiärfaserschicht mit HOTCHKISS-negativen Zellhöfen und HOTCHKISS-positiver Interzellulärschicht. Fixierung mit Formol-Alkohol, Schnittstärke 7 μ , Färbung nach PJS-Technik mit Perjodsäurelösung A, Vergr. 224-fach.

leichtes Genu varum. Die laterale Femurcondyle und die Patella waren gelbbraun verfärbt und aufgefasert. Histologisch fiel lediglich die größere Farbintensität der medialen belasteten Femurcondyle auf. Die unbelasteten Abschnitte der medialen und lateralen Condyle des oben schon erwähnten 74-jährigen Mannes mit schweren arthrotischen Defekten sind besonders intensiv angefärbt. In der überwiegenden Mehrzahl jedoch stammten die am intensivsten angefärbten Präparate der Radiärfaserschicht von belasteten Abschnitten. Sowohl histologisch als auch makroskopisch zeigen sie keine pathologischen Abweichungen. Besonders bei schweren Menschen ist die intensive Reaktion der Radiärfaserschicht regelmäßig nachweisbar.

Auffallend ist das histologische Ergebnis bei der Auswertung des vier Monate alten weiblichen Säuglings,



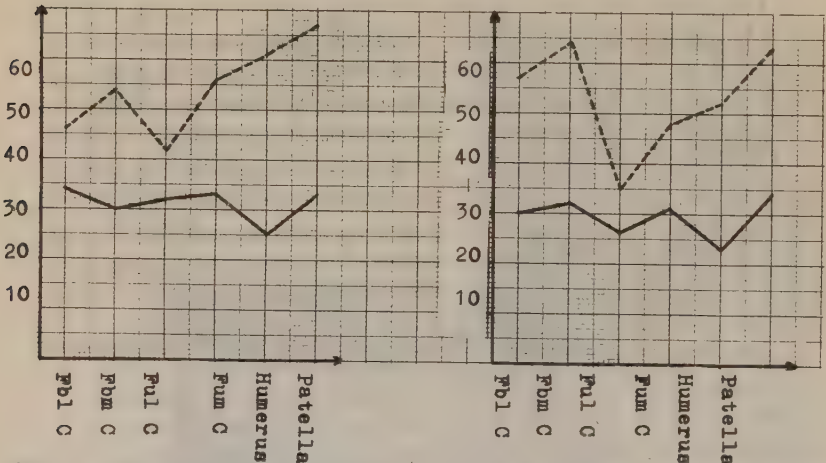
Säule 2. Bei einem Vergleich von lateralen und medialen Condylen zeigt die mediale eine höhere Farbintensität und höhere Zellenzahl als die laterale.
gestrichelt: höchste und niedrigste Werte.
1 = Farbintensität
2 = Zellenzahl

der 22-jährigen Frau und dem 22-jährigen Mann. Die Erwachsenen hatten einen athletischen Körperbau. Makroskopisch war der Knorpel äußerlich normal. Im histologischen Bild war die Farbintensität beim Säugling stark, bei den jugendlichen Erwachsenen schwach. Bei allen drei Leichenknorpeln ist die Farbintensität über alle Zonen gleichmäßig verteilt.

Auch an den Knorpeln dieser jungen Menschen ergibt ein Vergleich der lateralen und medialen Condylen eine größere Zellzahl und stärkere Farbintensität an den medialen gegenüber den lateralen Condylen.

2. Metachromasie mit Toluidinblau

Die Metachromasie soll auf einer Bindung der Farbstoffionen an negativ geladene Strukturen beruhen. Bei der histochemischen Auswertung der beiden mit Toluidinblau gefärbten Serien ergaben sich prinzipiell die gleichen Befunde, wie bei der vorher beschriebenen Methode nach HOTCHKISS. Das wird durch die beiden Kurven 4 und 5 veranschaulicht. Die nach einer selbst hergestellten Farbskala (s.S 12) ermittelten Durchschnittswerte der Farbintensitätseinheiten bei der Toluidinblau-Technik liegen höher als bei der PJS-Reaktion (s. Kurve 2 und 3 auf Seite 13 im Vergleich zu den Kurven 4 und 5).



Kurve 4. Verhältnis der Mittelwerte von Zellzahl und Farbin-tensitätswerten des gefriergetrockneten Materials nach Toluidinblaubehandlung

(Erklärung der Abk.s.S.11)

Kurve 5. Verhältnis der Mittelwerte von Zellzahl und Farbin-tensitätswerten des formolalkoholfixierten Materials nach Toluidinblaubehandlung

Das Plasma der Zellen zeigt eine metachromatische Reaktion. Die Zellhöfe sind orthochromatisch blau gefärbt. Das deutet darauf hin, daß sie keine oder nur wenig saure Substanzen enthalten. Bei der PJS-Technik sind sie nicht oder

nur ganz schwach rosa angefärbt. Bemerkenswert ist, daß die perichondrale Tangentialfaserschicht regelmäßig ungefärbt bleibt. Am Übergang von der Tangentialfaserschicht zur Übergangszone ließ sich stets eine scharfe Grenze beobachten, während sich zwischen Übergangszone und Radiärfaserschicht nur eine geringe Zunahme der Farbtintensität zeigte.

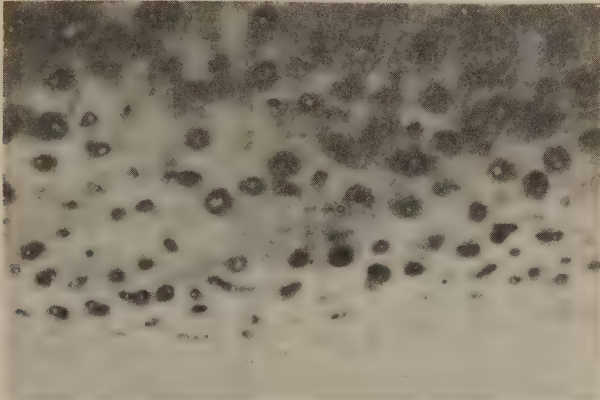


Abb. 3. Knorpel von der unbelasteten lateralen Femurcondyle eines adipösen 57-jährigen Mannes. Die Intercellularsubstanz der Tangentialfaserschicht ist ungefärbt. In der Übergangszone sind die Zellhöfe orthochromatisch, die intercelluläre Grundsubstanz ist metachromatisch gefärbt. Fixierung durch Gefrier-trocknung, Schnittdicke 7 μ , Färbung mit 1 %iger wässriger Toluidinblaulösung, Vergr. 113-fach.

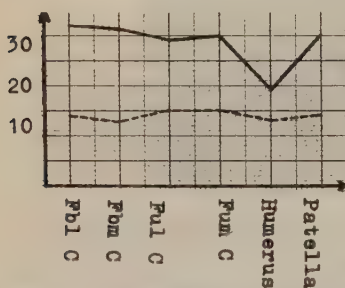
Die meisten Knorpel zeichnen sich durch eine kräftige Rotfärbung als Zeichen der Metachromasie aus.

3. Alcianblau-Kernechtrot-Färbung

Zu einem anderen Ergebnis führt die von GOMORI (1954) nach STEEDMAN modifizierte Methode. Auch Alcianblau färbt saure Mucopolysaccharide selektiv. Das Plasma konnte nicht angefärbt werden. MÜLLER (1959) fand nach der Alcianblaufärbung die inneren Zellhöfe diffus angefärbt und sonst nur im Gebiet der Asbestfaserung (= Tangentialfaserschicht) intensive Färbung. Er benutzte zur Färbung von hyalinem Rippenknorpel vom Menschen die Alcianblaufärbung nach Angaben von STEEDMAN.

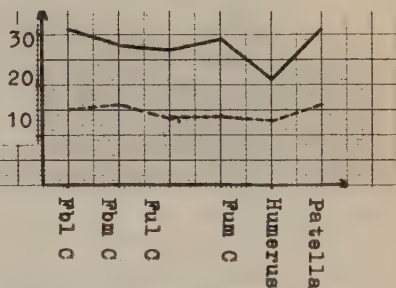
Die Farbintensität der Grundsubstanz war nach Anfärbung mit Alcianblau sehr gering. Sie erreichte nicht die hohen Werte der PJS- und Toluidinblaufärbungen.

Auch der Vergleich zwischen Zellzahl und Farbintensität ist nach Alcianblaubehandlung anders. In der oberflächlichen Tangentialfaserschicht und in dem direkt darauffolgenden ersten Drittel der Übergangszone erwies sich die Farbintensität am größten. Die Zellzahl ist in diesem Gebiet gering. Mit dem Zunehmen der Zellenzahl von der Tangentialfaserschicht zur knochennahen Radiärfaserschicht läßt die Stärke der Farbintensität rasch nach. In vielen Schnitten zeigte die Radiärfaserschicht keine Färbung.



Kurve 6. Verhältnis der Mittelwerte von Zellzahl und Farbin-
tensitätseinheiten des gefrorenge-
trockneten Materials nach Alcian-
blaubehandlung

(Erklärung der Abk.s.S.11)



Kurve 7. Verhältnis der Mittel-
werte von Zellzahl und Farbin-
tensitätseinheiten des formalal-
koholfixierten Materials nach
Alcianblaubehandlung

Vereinzelt ist die interterritoriale Grundsubstanz -
also Teile des Knorpels, die weit von den Zellen und Zell-
höfen entfernt liegen - schwach hellblau angefärbt.

Die meisten Schnitte boten stets das gleiche Bild. Nur
die Farbintensität der gefärbten Knorpel des vier Mona-
te alten Säuglings, der 22-jährigen Frau und des 22-jäh-
rigen Mannes verteilt sich gleichmäßig über alle Schich-
ten des Knorpels.

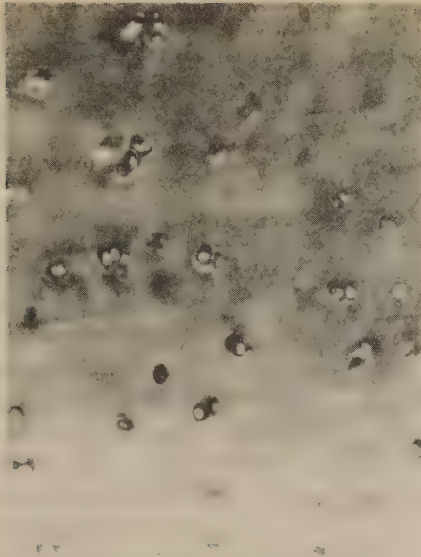
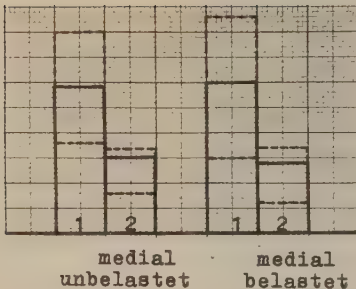


Abb. 4. Knorpel von der Patella einer 32-jährigen Frau. In der Tangentialfaserschicht ist die intercelluläre Grundsubstanz gefärbt im Gegensatz zur Übergangszone. Diese zeigt auf dem unteren Bildabschnitt Alcian-negative Zellhöfe und ungefärbte Grundsubstanz. Fixierung durch Gefriertrocknung, Schnittdicke 7 μ , Färbung mit Alcianblau-Kernechtrot, Vergr. 358-fach.

Aus den unten stehenden Säulen ist ersichtlich, daß die Intensität der gefärbten Strukturen mit zunehmender Zellzahl sinkt, bei geringerer Anzahl von Zellen aber relativ höher liegt. Als Beispiel ist die mediale unbelastete Femurcondyle mit geringerer Zellenzahl und einem größeren Farbwert gegenüber der belasteten medialen Condyle mit einem geringeren Farbwert und höherer Zellenzahl angeführt.

Das mit Formol-Alkohol-Gemisch fixierte Knorpelmateriale ist stärker gefärbt als das gefrorengetrocknete.

III. DISKUSSION



Säule 3. Die Farbintensität ist bei größerer Zellzahl an der belasteten medialen Condyle geringer als bei geringerer Zellzahl an der unbelasteten medialen Condyle.

gestrichelt: höchste und niedrigste Werte.

1 = Zellenzahl

2 = Farbintensität

Zellen und Grundsubstanz im Knorpel zusammen bilden eine funktionelle Einheit (SCHALLOCK, 1957). Die Grundsubstanz setzt sich aus kollagenen Fasern und einem Rest zusammen (SCHAFER, 1930). VIERNSTEIN (1958) bezeichnet den Rest, abweichend von der sonst gebräuchlichen Definition, als die "eigentliche Grundsubstanz". Der Mucopolysaccharid-proteinkomplex oder besser die in ihm enthaltene Chondroitin-

schwefelsäure ist die eigentliche Ursbstanz dieses Gewebes". Nach JORPES und YAMASHINA (1956) entfallen 20 - 30 % der Trockensubstanz des hyalinen Knorpels auf die Chondroitinschwefelsäure. Vermutlich ist darauf wesentlich die Anfärbung der Knorpelgrundsubstanz nach der PJS-Reaktion zurückzuführen. Vor allem die Metachromasie soll durch stark negativ geladene Strukturen entstehen, die die Farbstoffionen binden, oder weil zahlreiche S-haltige Gruppen im Substrat vorhanden sind (LIPP, 1954). MÜLLER (1959) führt die metachromatische Reaktion der Grundsubstanz des Knorpels auf Sulfatgruppen zurück. Er vermutet bei der Metachromasie andere Reaktionsmechanismen als nach der Färbung mit Alcianblau. PRITCHARD (1952) schließt auf die Existenz von Mucopolysacchariden, wenn eine positive PJS-Reaktion und Metachromasie nebeneinanderbestehen. Die PJS-Technik färbt neben Mucopolysacchariden noch Glykogen. Außerdem kann die Perjodsäure aus den Hydroxyaminosäuren Serin und Threonin, wenn sie an Pro-

teinketten endständig sitzen, Aldehydgruppen bilden. Ebenso aus dem Hydroxylysin in jeder Position der Proteinkette. Nach dem positiven Ausgang der reversiblen Acetylierung kann man die reaktionsfähigen Aminogruppen vernachlässigen (LIPP, 1954). Bei einem Vergleich der Schnitte, die der reversiblen Acetylierung unterzogen waren, mit den in den Serien gefärbten Schnitten, zeigt sich nämlich keine Zunahme der Farbtensitätseinheiten. Nach der Diastaseverdauung ist die Grundsubstanz schwach gefärbt. Vermutlich ist das auf einen Verlust an Glykogen und Mucopolysacchariden zurückzuführen. Bei der Verdauung mit Hyaluronidasen werden die Farbtensitätswerte nur leicht abgeschwächt. Wahrscheinlich beruht diese Abschwächung auf Verdauung von Mucopolysacchariden. Glykogen gibt mit Toluidinblau keine Metachromasie. Die trotzdem recht intensive metachromatische Reaktion der Schnitte ist dahingehend zu deuten, daß eventuell mehr reaktionsfähige Substanz vorhanden ist, die sich elektiv mit Toluidinblau anfärben läßt. Nach der PJS-Technik ergeben aber nur die Aldehydgruppen eine HOTCHKISS-positive Rotfärbung, die vorher durch die Perjodsäure gebildet wurden.

Ein Problem bei der Fixierung besteht in der "Alkoholflucht" des Glykogens. Es lagert sich in Form von gröberen Granula und Schollen zusammen. Das ist der Fall nach der Fixierung mit Formol-Alkohol. Nach der Gefriertrocknung ist das Glykogen diffus verteilt, die Granula sind feiner. MEYER und JEANLOZ (1943) behaupten, daß das Glykogen nicht an Eiweiß gebunden sei. Es könne jedoch von koagulierte Protein einfach mechanisch festgehalten werden, wenn die Glykogenteilchen von einer Eiweißmembran überzogen sind, durch die sie wegen ihrer Größe nicht hindurchdiffundieren können.

GERSH (1951) stellte eine Zunahme der Metachromasie bei Depolymerisation an Mucopolysacchariden fest. Während bei der Gefriertrocknung die hochpolymeren Mucopolysaccharide

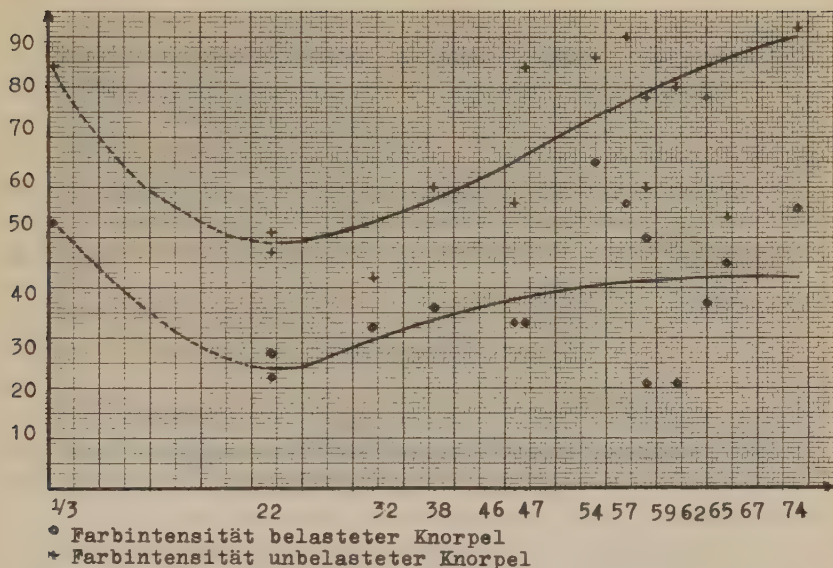
der Grundsubstanz in nativem Zustand erhalten bleiben, greift das Formol-Alkohol-Gemisch nicht unwesentlich in den Chemismus des Knorpelgewebes ein.

Das Vorhandensein von positiver HOTCHKISS-Reaktion und Metachromasie im Zellplasma und ihr Verschwinden, nachdem sie mit Hyaluronidasepräparaten verdaut sind, läßt vermuten, daß primär Chondroitinsulfat oder ähnliche Substanzen im Plasma vorkommen. Nach der Diastaseverdauung ist das Plasma noch gefärbt.

Besonders hohe Farbintensität nach PJS-Reaktion und Toluidinblau zeigen belastete Knorpel von schweren und alten Menschen, und auch die von solchen, die einer vorwiegend stehenden Beschäftigung nachgingen. SCHALLOCK und LINDNER (1957) behaupten, daß verstärkt nachweisbare Mucopolysaccharide an den Knorpelbasisabschnitten ein Indikator für einen krankhaften Vorgang seien. Die Vermehrung tritt aber nicht nur an belasteten, d.h. vermehrtem Druck und Zug ausgesetzten Stellen des Knorpels ein, sondern auch an unbelasteten, z.B. an den unbelasteten hinteren Teilen der lateralen und medialen Femurcondylen und am Humerus. Mein Untersuchungsgut setzte sich hauptsächlich aus Knorpeln gesunder Menschen zusammen. Es könnte sich meiner Meinung nach entweder um noch nicht erkennbare Degenerationen oder Vorstadien derselben handeln, wofür auch die Befunde der umfangreichen Röntgenuntersuchungen an Gelenken von SCHLIEPHAKE und SMETS (1960) zu sprechen scheinen. Andererseits scheint es möglich, daß im Verlauf der normalen Alterung die Mucopolysaccharide innerhalb der Grundsubstanz zunehmen.

An Kurve 8 fallen die hohen Farbintensitätswerte und die großen Zellzahlen bei dem untersuchten Säugling und bei sehr alten Individuen auf. Nach WAGONER (1941) vermindert sich die Zellzahl mit fortschreitendem Alter. Verhältnismäßig niedrig finden sich die Werte im Alter

von 22 bis 45 Jahren. Im Gegensatz zu WAGONER fand sich



Kurve 8. Abhängigkeit der Farbintensität belasteter und unbelasteter Knorpel vom Lebensalter.

an meinen Präparaten eine Vermehrung der Zellen im höheren Alter und auch bei höherem Körpergewicht.

MATTHEWS (1952) findet im Kniegelenksknorpel einen höheren Gehalt an Chondroitinschwefelsäure als im Schultergelenk. Er leitet die größere Elastizität der belasteten Knorpelgebiete von ihrem höheren Polysaccharidgehalt ab. Zunehmende Farbintensitäten, d.h. vermehrt Mucopolysaccharide finden sich nach meinen Befunden erst jenseits des 30. Lebensjahres. Besonders ausgeprägt ist die Farbintensität bei Personen von schwerem Körpergewicht und bei älteren Menschen. Bei erhöhter Belastung der Gelenke reagieren diese vermutlich mit einer vermehrten physiologischen Ablagerung oder Bildung von Mucopolysacchariden, möglicherweise auch von Glykogen.

GOMORI (1954), der dieselben Färbemethoden anwandte, beschrieb eine intensive und gleichmäßige Färbung der Knorpelgrundsubstanz. Für belastete und unbelastete Knorpelabschnitte kann ich seine Angaben nicht bestätigen. Nach der PJS-Reaktion und der Metachromasie durch Toluidinblau ist die Anfärbung zwar intensiv, aber unterschiedlich in den Knorpelzonen. Nach der Alcianblau-Kernechtrot-Technik ist die Farbtintensität gering und ebenfalls ungleichmäßig verteilt. Nur bei jungen Individuen komme ich zu einem ähnlichen Ergebnis wie GOMORI.

IV. ZUSAMMENFASSUNG

Knorpel aus belasteten und unbelasteten Gelenkregionen von 15 Leichen wurden verarbeitet. Um die histotopographische Verteilung der Grundsubstanz und Zellen festzustellen, verwendete ich drei Färbeverfahren. Neben den Hauptversuchen machte ich Vor-, Kontroll- und Verdauungsversuche.

Die Ergebnisse der Befunde aus der PJS-Technik nach HOTCHKISS und der Toluidinblau-Färbung sind übereinstimmend. Die perichondrale Tangentialfaserschicht ist schwach HOTCHKISS-positiv. Nach der Toluidinblaubehandlung ist sie weder orthochromatisch noch metachromatisch. Sie bleibt ungefärbt. Bei beiden Färbungen nimmt die Farbtintensität von der oberflächlichen perichondralen Tangentialfaserschicht zur Radiärfaserschicht an der Knorpelknochengrenze zu. Ebenso auch die Zellzahl. Die Zellhöfe weisen keine HOTCHKISS-positiven Substanzen auf. Mit der Toluidinblau-Technik sind sie orthochromatisch blau gefärbt. Das Zellplasma ist HOTCHKISS-positiv und metachromatisch.

In den nichtcelloidiinierten Schnitten, die mit Hyaluronidasen verdaut sind, ist das Plasma der Zellen nach PJS-Reaktion ungefärbt.

Die medialen Condylen haben mehr Zellen und größere Farbintensitätswerte als die lateralen.

An den Knorpeln mehrerer Leichen zeigen sich degenerative Veränderungen. Auch das histochemische Verhalten war verändert.

Die Farbintensität nach Anfärbung mit Alcianblau-Kernechtrot ist gegenüber der PJS-Technik und Toluidinblau geringer. Umgekehrt wie nach der HOTCHKISS-Methode ist die perichondrale Tangentialfaserschicht stärker tingiert als die Radiärfaserschicht. Bei großer Zellenzahl verschwindet die Färbung der Grundsubstanz oft völlig.

Vor allem nach Anwendung der PJS-Technik sind die Präparate, die mit Formol-Alkohol fixiert wurden, intensiver gefärbt als das gefrorengetrocknete Material.

- AMPRINO, R.: Distribution of S^{35} sodium sulfate in early chick embryos. *Experientia* (Basel) 11,1-6 (1955).
- BARNETT, R.J. and SELIGMAN, A.M.: The histochemical demonstration of sulphydryl and disulphide groups of protein. *J.Nat.Cancer inst.* 14,769-803 (1954).
- BÉLANGER, L.F.: Autoradiographic visualisation of the entry and transit of S^{35} in cartilage, bone and dentine of young rats and the effect of hyaluronidase in vitro. *Canad.J.Biochem.* 32,161-169 (1954).
- BENNINGHOFF, A.: Experimentelle Untersuchungen über den Einfluß verschiedenartiger mechanischer Beanspruchung auf Knorpel. *Verh.anat.Ges.* 31.Verslg.250-267,Halle/S. (1921).
- BERENSON, G.S., W.M.LUMPKINS and V.G.SHIPPI: Study of the tissue course of acid mucopolysaccharides by fibroblasts in a synthetic medium. *Anat. Rec.* 132, 585-596 (1958).
- BURKL, W. und A.SONNENSCHNIG: Über Vorkommen und Verteilung der Mucopolysaccharide in der Synovialis bei Erkrankungen der Kniegelenke. *Virchows Arch. Bd.* 322, 442-451 (1952).
- CURRAN, R.C.: Observations on the formation of collagen in quartz lesions. *J.Path.Bact.* 66,271-282 (1953).
- DAVIES, D.V.: Specificity of staining methods for Mucopolysaccharides of the hyaluronic acid type. *Stain Tech.* 27, 65-70 (1952).
- EICHELSBERGER, L., T.D.BROWER and M.ROMA: Histochemical characterization of inorganic constituents, connective tissue and the chondroitin sulfate of extracellular and intracellular compartments of hyaline cartilages. *Am.J.Physiol.* 166, 328-339 (1951).
- EKHOLM, R.: Osteo-arthritis in the knee-joint with special references to the weight-bearing in the joint. *Acta morph.neerl.scand.* Vol.I, 63-69 (1956).
- FLASCHENTRÄGER: Physiologische Chemie, Die Stoffe, Bd. I, 751-767, Springer-Verlag, Berlin-Göttingen-Heidelberg (1951).
- FRENCH, D. and J.T. EDWARDS: The reactions of formaldehyde aminoacids and proteins. *Adv.Prot.Chem.* Vol. II, 277-335 (1945).
- GERSH, J.: Ground substance and the plasticity of connective tissues. *Harvey lect.* 45,211-241 (1949/50).
- ders.: Some functional considerations of ground substances of connective tissue. 2nd Conf. on Connective Tissue, Josiah Macy Jr. Foundation. 11-44 (1951).
- GOMORI, G.: Aldehyde-Fuchsin: a new stain for elastic tissue. *Am.J.clin.Path.* 20, 665-668 (1950).
- ders.: The histochemistry of mucopolysaccharides. *British J. of exp.pathol.* 35,377-380 (1954).
- GRAUMANN, W.: Die histochemische Reaktion der Knorpelgrundsubstanz mit Perjodsäure und Bleitetraacetat. *Mikroskopie* 8, 218-225 (1953).
- ders.: Zur Standardisierung des Schiff'schen Reagens. *Zeitschr. f.Wiss.Mikroskopie*, 61,225-226 (1953).
- ders. und K. NEUMANN: Handbuch der Histochemie, Bd. I/1,1-77, 430-431, Gustav Fischer Verlag Stuttgart (1958).

- GROSSFELD, H., K. MEYER and G. GODMAN: Differentiation of fibroblasts in tissue culture as determined by mucopolysaccharide production. Proc.Soc.exp.Biol. 88, 31-35 (1955).
- ders. and K. MEYER: Acid mucopolysaccharides produced in tissue culture. Anat.Rec. 124, 489 (1956).
- ders., K. MEYER, G. Godman and A. LINKER: Mucopolysaccharides in tissue culture. J.biophys.biochem.Cytol. 3,391-396 (1957).
- HALE, C.W.: Histochemical demonstration of acid polysaccharides in animal tissue. Nature 157,802 (1946).
- HANSEN, F.C.C.: über die Ursachen der metachromatischen Färbung bei gewissen basischen Farbstoffen. Zeitschr.wiss.Mikr. 25,145-153 (1908).
- HARTLEIB, J.: über die Anwendung der Gefriertrocknung in der histologischen Technik. Acta histochem. 1,135-145 (1954).
- HASELMANN, H.: Vergleichende Untersuchungen zur histologischen Gefriertrocknung. Anat. Anz. 101, Erg.H. 158-166, (52. Vers.Anat.Ges.) (1954).
- HOLCZINGER, L.: Bildung von Aldehydgruppen in formolfixiertem Gewebe. Acta histochem. 6,36-43 (1958).
- HOLMES, W.C.: The chemical nature of metachromasy. Stain Tech. 116-122 (1926).
- HOLMGREN: zit. nach B. Romeis.
- HOTCHKISS, R.D.: A microchemical reaction resulting in the staining of polysaccharide structures in fixed tissue preparations. Arch.Biochem.16,131-141 (1948).
- JOEL, W., Y.F. MASTERS and M.R. SHETLAR: Comparison of histochemical and biochemical methode for the polysaccharides of cartilage. J.Histochem.Cytochem. 4,476-478 (1956).
- JORPES, E. and J. YAMASHINA: Die mucopolysaccharide und Glykoproteide des Bindegewebes. 7.Colloquium der Ges. für Physiol.Chem. 25-42 Berlin-Göttingen-Heidelberg, Springer (1956).
- KELLY, J.W.: The use of metachromasy in histology, cytology and histochemistry. Acta histochem.(Jena) Suppl.1,85-102 (1958).
- KLING, D.H. and G. CAMERON: Morphological and physiological study of tissue cultures of human and mammalian synovial membranes. Anat.Rec.121,472 (1955).
- KNEESE, K-H. and A. KNOOP: Über den Ort der Bildung des Mucopolysaccharidproteinkomplexes im Knorpelgewebe. Elektronenmikroskopische und histologische Untersuchungen. Zeitschr.f.Zellf.53,201-258 (1961).
- KRAMER, H. and G.M. WINDRUM: The metachromatic staining reactions. J.Histochem.Cytochem. 3,227-237 (1955).
- KRUKENBAERG: Die chemischen Bestandteile des Knorpels. Z. Biol. 20, 307-326 (1884).
- LANDSMEER, J.M.F.: Some colloid chemical aspects of metachromasia. Influence of pH and salts on metachromatic phenomena evoked by toluidine blue in animal tissue. Act.physiol.pharmacol.neerl.2,112-128(1951).
- LAVES, W.: Histologische Untersuchungen über die Wirkung der Hyaluronidase auf Knorpel. Klin.Wochenschr.Jg.26,H.33/34,534-539 (1948).

- LILLIE, R.D.: Reversal of Cyanide blockade of aldehyde reactions by reoxidation with periodic acid. *J.Histochem.Cytochem.* 4,479-480 (1956).
- LIPP, W.: *Histochemische Methoden*, Verlag Oldenbourg, München (1954-1957).
- MANCINI, R.E., E.S. de LUSTIG and E. NUNEZ: Radiosulfur intake by mucopolysaccharides of embryonic and cultured connective tissues. *Anat.Rec.* 124,493-494 (1956).
- MATTHEWS, B.F.: Collagen/Chondroitin sulphate ratio of human articular cartilage. *British Med. Journ.* Vol.II.1295 (1952).
- MAYERSBACH, H.: Möglichkeiten der Artefaktbildung bei der Nachbehandlung gefrorengetrockneten Zellmaterials. *Acta anat.* 30, 487-507 (1957).
- McMANUS, J.F.A. and J.F. CASON: Carbohydrate chemistry studied by acetylation techniques. *J.exp.Med.* 91,651-654 (1950).
- MEYER, K und R. JEANLOZ: Recherches sur l'amidon XXV. Le glycogène de muscle natif. *Helv.Chim.Acta*, Vol.XXVI, 1784-1798 (1943).
- MÜLLER, G.: Die Darstellung saurer Mucopolysaccharide durch die Toluidinblau-Metachromasie, die Alcianblau-Färbung, die PAS-Reaktion und Ferrihydroxydsol-PAS-Reaktion. *Act.histochem.* 6,218-224 (1954).
- MULLER, W.: Die Biologie der Gelenke. Leipzig, Joh. Ambr. Barth (1929).
- NEUMANN, K.: Grundriß der Gefriertrocknung. 2.Aufl. Musterschmid Wissenschaftlicher Verlag, Göttingen-Frankfurt-Berlin, (1955).
- OTTE, P.: Die Existenzbedingungen des Gelenkknorpels (ein Beitrag zur Arthrosis-Forschung). *Arch.f.orthop.u.Unf.-Chir.* 48,154-158 (1956).
- PRITCHARD, J.J.: A cytological and histochemical study of bone and cartilage formation in the rat. *J.Anat.* 86,259-277 (1952).
- ROMEIS, B.: *Mikroskopische Technik*, Leibniz-Verlag, München (1948).
- RUYTER, J.H.C.: Experimental study of the periodic acid-Schiff reaction. *Act.morph.neerl.scand.* Vol.II, 110-114 (1958).
- SÄÄF, J.: Übungseffekte an ausgewachsenem Gelenkknorpel, eine experimentelle Untersuchung über die Regenerationskraft von erwachsenem Knorpel an Meer-schweinchen. *Act.orthop.scand.Suppl.* 7,86-94 (1950).
- SCHAFER, Z.: Die Stützgewebe. in: *Handbuch der mikroskopischen Anatomie des Menschen*. Bd.II/2, 210-390 (1930).
- SCHALLOCK, G.: und H. LINDNER: Beitrag zur Frage der Entmischungszustände in den Grundsubstanzen des Bindegewebes. *Medizinische, Forschung und Praxis*, 12-20 (1957).
- SCHEIBE, G. und V. ZANKER: Physikochemische Grundlagen der Metachromasie. *Act.histochem.* (Jena) Suppl. 1, 1-37 (1958).
- SCHLIEPHAKE, E. und R. SMETS: Die physikalische Therapie und Balneotherapie entzündlicher und degenerativer Erkrankungen des Bewegungsapparates. II. Teil, *Münch.Med.Wochenschr.* 2631-2633 (1960).

- SCHUBERT, M. and D. HAMERAN: Metachromasia; chemical theory and histochemical use.
J.Histochem.Cytochem. 4,158-189 (1956).
- SHETTLAR, M.R. and Y.F. MASTERS: Effect of age on polysaccharide composition of cartilage.
Proc.exp.Biolog.(N.Y.) 90,31-33 (1955).
- TAYLOR, H.E. and A.M. SOUNDERS: The association of granulation tissue ground substance with fibroblastic activity. Am.J.Pathol.32,617-624 (1956).
- VIERNSTEIN, K.: Untersuchungen über den normalen und arthrotischen Gelenkknorpel.
Habilitationsschrift, München (1958).
- WAGONER, G., O. ROSENTHAL and M.A. BOWIE: Studies of the cell in normal and arthritix bovine cartilage.
Am.J.Sciences, N.S. 201,489-495 (1941).
- WOLMAN, M. and J. GRECO: The effect of formaldehyde on tissue lipids and histochemical reactions for carbonyl groups. Stein Tech. 27,317-324 (1952).
- YIELDING, K.L., G.H. TOMKINS and J.J. BUNIM: Synthesis of hyaluronic acid by human synovial tissue slices.
Science 125, 1300-1303 (1957).
- ZACHARIAE, F. and M.O. DYPBYE: Methodes for isolation and identification of acid mucopolysaccharides in connective tissue. Act.rheum.scand.5,190-205(1959).
- ZBINDEN, G.: Über Feinstruktur und Altersveränderungen des hyalinen Knorpels im elektronenmikroskopischen Schnittpräparat und Beitrag zur Kenntnis der Verfettung der Knorpelgrundsubstanz.
Schweiz.Z.allg.Pathol.16,165-189 (1953).

Lebenslauf

Am 31. Januar 1936 wurde ich, Rüdiger Albrecht, in Erfurt als Sohn des Mittelschullehrers Werner Albrecht und seiner Ehefrau Erna, geb. Röwer, geboren. Vom September 1942 bis Juni 1950 besuchte ich in Erfurt die Grundschule. Im Herbst 1950 trat ich in die Klasse 9C des altsprachlichen Zweiges der Heinrich-Mann-Oberschule ein. Diese Schule besuchte ich vier Jahre. Die Reifeprüfung legte ich Ostern 1956 am Ratsgymnasium in Osnabrück ab, wo meine Familie seit 1954 wohnt.

Im Sommersemester 1956 begann ich an der Ludwig-Maximilians-Universität München das Studium der Medizin. Ich studierte alle elf Semester in München. Im Sommersemester 1958 bestand ich die ärztliche Vorprüfung und vom 11. September bis 13. Dezember 1961 legte ich das medizinische Staatsexamen ab. Am 19. Dezember fand meine Promotion statt. Jetzt bin ich Medizinalassistent am Krankenhaus Mittenwald.

